IL FERMENTO COAGULANTE

DEL

BACILLO PRODIGIOSO

PEL

Dott. COSTANTINO GORINI

PERITO MEDICO IGIENISTA

ASSISTENTE ALL'ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

(*Direttore:* **Prof. A. SORMANI**)

ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1893

IL FERMENTO COAGULANTE

DEL

BACILLO PRODIGIOSO

PEL

Dott. COSTANTINO GORINI

PERITO MEDICO IGIENISTA

ASSISTENTE ALL'ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

(*Direttore:* **Prof. A. SORMANI**)

ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1893

ESTRATTO dalla *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*
Anno IV, N. 15 del 1° agosto 1893.

IL FERMENTO COAGULANTE DEL BACILLO PRODIGIOSO

PEL

DOTT. COSTANTINO GORINI

Perito medico igienista
Assistente all'Istituto d'Igiene della R. Università di Pavia

(*Direttore:* PROF. A. SORMANI)

In una nota preventiva, apparsa in questa *Rivista* nel settembre 1892, io segnalava la produzione per parte del B. Prodigioso di una sostanza capace di coagulare il latte senza acidificarlo, e corredavo la mia comunicazione dei dati strettamente necessari a dimostrare che quella sostanza apparteneva alla classe degli enzimi batterici.

Ulteriori ricerche mi hanno messo in grado di confermare la mia asserzione non solo, ma altresì di riscontrare in questo fermento coagulante o, come propone L'ARMSTRONG [1], *trombogenico* alcune proprietà che lo rendono, a mio credere, non privo di interesse.

Egli è perciò che mi induco a renderle qui di pubblica ragione, raggruppando, anche a complemento di quei primi appunti, parecchie sperienze fatte in parte nel Laboratorio di bacteriologia della Direzione di sanità di Roma, in parte nell' Istituto d' igiene della R. Università di Pavia.

---

[1] *Journal of the Chemical Soc.* LVII, 1890.

Il metodo sperimentale impiegato per i miei studi, tranne qualche lieve variazione, consiste essenzialmente in questo:

Si preparano da un lato delle provette contenenti sempre una medesima quantità (di solito 5 cm. c.) di latte sterilizzato - dall'altro lato, delle colture pure di B. Prodigioso, preferibilmente in brodo peptonizzato Loeffler tenuto a 37°. Si sottopone ora il latte ora la colture, ai diversi trattamenti richiesti dal caso, e poi, con pipette graduate sterilizzate si versano date quantità di colture entro le provette di latte, che si mettono in stufa a 37° C. A periodi determinati della giornata (mattina, mezzogiorno, sera, mezzanotte) si esamina lo stato del latte, inclinando leggermente le provette e, appena accertatane la coagulazione, se ne assaggia con cartine di tornasole la reazione, che, come dissi nella nota preventiva, si conserva inalterata da quella propria del latte sterilizzato, e se ne controlla l'amicrobicità mediante abbondanti innesti in brodo-Loeffler tenuti 48 ore a 37°.

Ogni prova viene ripetuta almeno due volte, e le prove comparative si eseguiscono sopra latte di uguale provenienza, di ugual data, ugualmente trattato e ugualmente sterilizzato. Insisto su queste particolarità giacchè nel corso delle mie sperienze io ho avuto campo di constatare una differenza non trascurabile nel modo di comportarsi del latte a seconda che esso è sterilizzato da poco o da molto tempo, è intero o spanna, è sterilizzato nell'autoclave per 10 muniti a 1, 2 atmosfere (circa 110° C.), o nella pentola Koch a 100° per 4 ore una sol volta, o 20-10 minuti per tre o quattro giorni consecutivi.

Ho creduto opportuno di premettere queste poche generalità affine di esonerarmi dal ripeterle ad ogni singola esperienza che riferirò a comprova delle mie affermazioni E, a proposito di esperienze, soggiungo ancora che, per amore di brevità, io mi limiterò a riportare quelle più importanti e dimostrative, lasciando da banda le accessorie, le quali servirono a me per convincermi sulla esattezza dei risultati, ma per altri riuscirebbero superflue.

Ed ora passiamo a vedere sotto quali e quanti aspetti sia interessante il fermento trombogenico del B. Prodigioso.

I. — Esso è formato da un bacterio che normalmente coagula il latte con reazione acida, mentre tutti i bacteri finora conosciuti,

che producono presame, coagulano il latte sempre con reazione neutra o alcalina. Tali sono, secondo Scholl [1], i bacilli *Pyocyaneus*, *Butyricus* e *Mesentericus vulgatus*; tali sono pur anche i numerosi bacteri innominati che Conn isolò da una crema [2].

Il Prodigiosus sarebbe finora l'unico bacterio capace di coagulare il latte per due vie: o per precipitazione della caseina mediante acidificazione (fermentazione vitale) o per coagulazione propriamente detta della caseina mediante presame (fermentazione chimica). Esso sarebbe cioè ad un tempo un fermento delle sostanze ternarie (lattosio) e delle sostanze quaternarie (caseina), cosa non del tutto comune [3].

A seconda delle circostanze, interverrà o, meglio dire, prevarrà l'una piuttosto che l'altra di queste azioni.

Così si spiega il perchè il latte addizionato con bicarbonato di soda coaguli prima di quello addizionato con acido borico quando, previa sterilizzazione, vengono innestati con una coltura vivente di Prodigiosus, e viceversa, la coagulazione del secondo preceda quella del primo, quando, previa sterilizzazione, vengono trattati con una coltura sterilizzata dello stesso Prodigiosus.

È noto infatti da un lato che lo sviluppo dei bacteri acidificanti è favorito dalla presenza dei carbonati alcalini, ed è rallentato invece dall'acido borico [4], e dall'altro lato che l'azione del presame in genere è ostacolata dagli alcalini e coadiuvata dagli acidi [5].

Esperienza:

Il 23-2-93 si prendono sei provette contenenti ciascuna cinque cm. c. di latte sterilizzato, di cui due furono previamente addizionate con bicarbonato sodico nella proporzione del 3 °/₀₀, e altre due con acido borico nella proporzione dell' 1.5 °/₀₀.

Se ne seminano tre (una *A* di latte semplice, una *B* di latte sodato, una *C* latte borato) con un'ansa di coltura in brodo di Prodigiosus di 24 ore, e nelle altre tre provette, che indicheremo rispettivamente con *D-E-F*, si versa ½ cm.c. di una coltura in brodo di Prodigiosus di 9 giorni, dopo di averla sterilizzata a 60-65° C. per un'ora.

---

[1] Scholl. *Die Milch, ihre häufigeren Zersetzungen* ecc. Wiesbaden, 1891.

[2] Conn. Isolirung eines Labfermentes aus Bakterienkulturen. *Centralbl. f. Bakt*, ecc. n. 7-8, Bd. XII.

[3] Duclaux. Principes de laiterie, Paris, 1893, pag. 57.

[4] Lazarus. *Zeitschrif f. Hygiene*, VIII, pag. 207.

[5] Arthur et Pogès. *Archiv. de plusy. norm. et pathol.* 1890.

Ecco i risultati:

La provetta *A* coagula entro. . . .	18 ore	reazione acida
» » *B* » »	22 »	
» » *C* » »	62 »	
» » *D* » »	60 »	reazione invariata
» » *E* » »	8 giorni	
» » *F* » »	50 ore	

I trapianti in brodo delle *A-B-C* riescono positivi: quelli delle *D-E-F* riescono negativi.

Così pure, se aggiungiamo al latte sterilizzato una goccia di essenza di senape (solfocianuro di allile) e poi lo seminiamo con una data quantità di cultura vivente di Prodigioso, il latte coagula non più con reazione acida, come di solito, ma con reazione neutra, appunto perchè l'essenza di senape arresta le manifestazioni vitali del bacterio, ma non sospende l'azione del presame contenuto nella cultura.

Esperienza:

Il 2-3-92 si versa $^1/_2$ cmc. di cultura A in brodo di 6 giorni di Prodigiosus, in due provette contenenti 5 cmc. di latte sterilizzato, ad una delle quali si aggiunge anche una goccia di essenza di senape.

Entro 24 ore è coagulato il latte non senapato, con reazione molto acida; e con innesto in brodo positivo; l'altro latte coagula invece dopo 48 ore, con reazione inalterata, e dà innesto in brodo negativo.

II. — Questo fermento si produce su tutti i mezzi *ordinari* di cultura (brodo semplice e peptonizzato - patate - gelatina - agar), e non solamente nel latte o in brodo addizionato di lattosio, come Duclaux e Conn [1] hanno trovato per il fermento dei bacteri da loro studiati.

Dunque la formazione del presame da parte del Prodigiosus non è legata alla presenza di nessuno dei componenti del latte.

Esperienze:

Brodo e patate — Credo inutile riferire qui le prove fatte colle culture di Prodigiosus in brodo semplice e peptonizzato, e su patate, giacchè ne dovrò parlare poi più innanzi a proposito di altri argomenti.

---

[1] Conn. Report on State board, 1890.

Gelatina - Il 24-7-92 si sterilizza a 60-65 per un'ora una cultura di Prodigiosus in gelatina, che si è completamente fusa, e se ne versa 1 cc. in una provetta di latte sterilizzato.

Il giorno appresso il latte è coagulato, con reazione invariata e dà innesto in brodo negativo.

Agar-agar - Il 30-7-92 si raschia con spatola di platino sterilizzata la superficie di una cultura di 10 giorni di Prodigiosus sopra agar soliditicato in capsula Petri; si raccoglie la raschiatura in una provetta sterilizzata nella quale si versano 10 cmc. di glicerina diluita in acqua al 40 %. Si mette il tubo in stufa a 37°, allo scopo di agevolare la soluzione del fermento nella glicerina. Dopo 6 giorni si mette la provetta contenente l'estratto glicerico a 60° per 1 ora; indi si versa $^1/_{10}$ di cmc. della parte liquida sopranuotante in una provetta di latte sterilizzato.

Questo coagula entro 2 giorni, con reazione invariata e dà innesto in brodo negativo.

III. — Questo fermento assomiglia sotto molti riguardi al caglio vitellino, in quantochè la sua efficacia:

a) è molto maggiore a 37-40° C. anzichè a temperature inferiori;

b) è ritardata dagli alcalini;

c) è indebolita dall'azione del riscaldamento;

d) sta in rapporto colla quantità del latte da una parte, e con quella del fermento dall'altra.

Si assomiglia inoltre, in quantochè:

e) esso è estraibile con acqua e non con alcool.

Esperienze:

a) 16-2-93. Una cultura in brodo di 3 giorni di Prodigiosus viene sterilizzata a 60-65° C. per un'ora. Se ne versa $^1/_2$ cm.c. per ciascuna in due provette contenenti 5 cm.c. di latte sterilizzato, di cui se ne mette una a 37° e l'altra a 20° C.

Il 20-2-93 è coagulato il latte a 37° e soltanto il 3-3-93 coagula il latte a 20° C.

Reazione invariata e controlli negativi per entrambi.

b) Riguardo all'azione ritardatrice degli alcalini, v. esperienza al capitolo I.

c) 26-7-92. Una cultura in brodo di 22 giorni viene divisa in due parti; una parte viene sterilizzata a 60-65° C. per un'ora; l'altra viene sterilizzata mediante filtrazione attraverso porcellana. Si versa $^1/_2$ cm.c. di ciascuna rispettivamente in due provette contenenti 5 c.c. di latte sterilizzato.

Il latte trattato con cultura filtrata coagula il 29-7-92 (dopo 3 giorni), quello trattato colla stessa cultura riscaldata, coagula il 1-8-92 (dopo 6 giorni).

Reazione inalterata e innesti sterili per entrambi.

d) Riguardo alla quantita di fermento e alla quantità di latte, mi riporto alla Nota preventiva [1].

e) 1-8-92. Si mette ad essiccare nel vuoto, a temperatura dell'ambiente, in un essiccatore ad acido solforico, tenuto al riparo dalla luce diretta, una cultura in brodo di 8 giorni, filtrata attraverso porcellana.

L'11-9-92, il residuo secco viene trattato prima con poco alcool assoluto; poi, previa filtrazione attraverso carta bibula, con poca acqua distillata sterilizzata.

Si svaporano a modico calore i due estratti alcoolico ed acquoso, ed i residui vengano messi ciascuno in latte sterilizzato, addizionato con una goccia di essenza di senape.

Il 12-9-92 è coagulato il latte trattato coll'estratto acquoso; l'altro non coagulò neppure dopo un mese.

Quest'esperienza prova altresi che il fermento coagulante del Prodigiosus resiste molto tempo all'essiccazione ed alla luce diffusa.

e bis) L'1-10-92. Si filtra attraverso porcellana una cultura in brodo di 11 giorni, e si concentra il filtrato nel vuoto fino a circa $^1/_3$ del suo volume, lo si versa a goccie a goccie in una quantità decupla di alcool assoluto; si lascia depositare per 6 ore – si filtra per carta – si essica il precipitato entro il filtro stesso tenendolo in stufa a 37° per 12 ore. Si ha una crosticina nerastra aderente alla carta bibula; ne la si stacca con una spatolina, e la si scioglie in poca acqua dist. ster.; di questa soluzione se ne versano alcune goccie in una provetta di latte sterilizzato, addizionata con una goccia di essenza di senape.

Entro 8 ore il latte è coagulato, e dà controllo negativo.

IV. — Questo fermento si differenzia però completamente dal caglio vitellino e da tutti i presami bacterici fin qui studiati, per il fatto di essere distrutto soltanto dalla temperatura dell'ebollizione prolungata per $^1/_2$ ora.

Ho consultato la maggiore e miglior parte della ricca letteratura moderna sull'argomento, e non vi ho rintracciato nessun

---

[1] *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*. Settembre 1892.

altro enzima bacterico che sia tanto resistente alle elevate temperature, in istato umido!

Trattandosi di un reperto alquanto sorprendente, credo opportuno riportare qui parecchie esperienze:

a) 15-1-93. Una cultura in brodo di 5 giorni viene tenuta in bagno-maria a 100° per 5 minuti.
Se ne versa 1 cm.c. in una provetta di latte sterilizzato.
17-1-93. Il latte è coagulato, ed amicrobico.

b) 18-1-93. La stessa cultura viene rimessa a 100° per altri 10 minuti.
Se ne versa 1 cm.c. in latte sterilizzato.
20-1-93 Il latte à coagulato ed amicrobico.

c) 21-1-93. Si prende una cultura in brodo di 2 giorni, e se ne mette una parte per 1 ora a 90° in bagno-maria; una seconda parte per 5 minuti a 100°; una terza per 15 minuti pure a 100° C.
Di ciascuna si versa $^1/_2$ cm.c. in provette contenenti 5 cm.c. di latte sterilizzato.
26-1-93. Coagulato il primo latte.
27-1-93. » secondo »
6-2-93. » terzo »
Tutte e tre sono amicrobici.

d) 2-2-93. Due culture in brodo, una di 1 giorno ed una di 22 giorni, vengono tenute per $^1/_2$ ora in un bagno-maria a 100° C.
Di ciascuna si versa 1 cm.c. in latte sterilizzato. Nessuna delle due provette è coagulata, nemmeno dopo un mese.

V. — Questa sua potenza eccezionale potrebbe far pensare che il principio coagulante del Prodigiosus non appartenga alla classe dei fermenti ma a quella delle proteine bacteriche.

Senonchè, contro una tale ipotesi sta il risultato di una prova da me fatta in base al metodo Roemer per la estrazione delle sostanze proteiniche dal contenuto bacterico.

Il metodo Roemer [1] consiste essenzialmente in questo:

Da culture ben sviluppate su patate si raschia accuratamente la massa bacterica e la si stempera in fina emulsione in acqua dist. ster. nella proporzione dell'1 : 10. Si sterilizza al calore detta emul-

[1] Roemer. Darstellung und Wirkung proteinhaltiger Bakterienextrakte. *Berlin. Klin. Wosh.* 1891. N. 51.

sione, poi la si lascia circa 4 settimane alla temperatura della camera o della stufa e, lungo questo periodo di tempo, la si fa bollire ripetutamente per parecchie ore, in modo che, prima di essere usata, essa abbia bollito complessivamente per 30-40 ore.

Infine, si filtra l'emulsione attraverso porcellana, e si ha un filtrato che contiene la massima quantità delle proteine bacteriche, quasi prive di fermenti.

Come si vede, la resistenza delle proteine al calore è di gran lunga superiore a quella per quanto ragguardevole del fermento coagulante del Prodigiosus; per cui il processo Roemer esclude già a priori la possibilità di scambiare le due sostanze. Ripeterlo tutto sarebbe quindi stato un lavoro inutile; ho pensato allora di usufruirlo per metà, o meglio di utilizzare il principio sul quale esso si fonda.

A tal uopo, con un coltellino sterilizzato raschiai una cultura rigogliosa di Prodigiosus di 4 giorni a 20° C. su quattro mezze patate, la stemperai in circa 20 cm.c. di acqua dist. ster., e subito dopo (onde lasciare il minor tempo possibile al contenuto bacterico di fuoruscire, per le condizioni sfavorevoli di nutrizione in cui venivano a trovarsi i bacilli nel nuovo ambiente) la filtrai attraverso porcellana. Il filtrato, che doveva contenere soltanto in massima parte i prodotti di ricambio del Prodigiosus (cioè gli enzimi e non le proteine), era limpido, incoloro e di reazione neutra; esso, mescolato in quantità variabile a latte sterilizzato, lo coagulò in diverso tempo, ma sempre amicrobicamente.

VI. — Del resto, il fermento coagulante si lascia perfettamente isolare e separare dal fermento proteolitico del medesimo Prodigiosus, mediante il processo Blumenthal-Conn [1].

Ecco come ho proceduto:

In una boccetta Erlenmeyer contenente circa 50 cm c. di latte sterilizzato ho seminato il Prodigiosus.

Ho tenuto la cultura a 20° C. per 11 giorni (9 dalla coagulazione); poi l'ho sbattuta con po a acqua dist. ster. per suddividere il coagulo e sciogliere il fermento; l'ho filtrata attraverso porcellana - ottenni un filtrato limpido, quasi incoloro, di odore di brodo *consumé* e con reazione leggermente acida.

[1] Loc. cit.

Lo versai in un bicchiere da precipitato, lo acidificai con 0.1 % di acido solforico, per il che non avvenne nessun precipitato; vi aggiunsi del cloruro di sodio puro e soppestato, fino a forte eccesso, lasciai il tutto sotto una campana di vetro (dove misi pure, a scopo antisettico, una vaschetta scoperta contenente del cloroformio), per 12 ore.

In questo frattempo si portò alla superficie del liquido una schiuma bianco-nevosa, che separai mediante filtrazione per carta, e quindi essiccai entro il filtro stesso tenendola in stufa a 37° per 24 ore. Rimase una polvere bruno-verdastra, un pizzico della quale coagulò il latte in 3-4 ore, amicrobicamente, mentre si mostrò incapace di ridisciogliere il coagulo, e non fuse affatto o appena debolissimamente la gelatina colla quale era stata messa in contatto.

VII. — Come ultimo reperto, dirò infine che questo fermento si produce in maggior quantità a 20° anzichè a 37° C. (ciò si accorda anche coi risultati di Conn), e meglio in brodo con peptone anzichè in brodo semplice.

Tutto all'opposto si comporta il fermento proteolitico dello stesso Prodigiosus e di altri bacteri liquefacenti studiati dal Macfadyen [1].

Esperienza:

8-3-93. Si prendono 4 provette contenenti ciascuna 5 cm.c. di latte sterilizzato. Si versano nella:

1ª	1 cm.c. di cultura	in brodo Loeffler,	di 7 giorni,	a 20° C.
2ª	»	»	»	a 37° C.
3ª	»	semplice	»	a 20° C.
4ª	»	»	»	a 37° C.

Tutte e quattro le culture erano state previamente sterilizzate a 60-65 per un'ora.

10-3-93	coagulata	la 1ª provetta
12-3-93	»	la 2ª »
13-3-93	»	la 3ª »
15-3-93	»	la 4ª »

Tutte e quattro risultarono amicrobiche.

Esposte così le particolarità del fermento coagulante del B. prodigiosus, io non saprei come meglio chiarirle e sanzionarle ad un tempo, se non riproducendo le parole con cui Duclaux abbraccia i vari presami a pag. 70 del suo ultimo lavoro: *Principes*

---

[1] AL. MACFADYEN. *Journal of Anat. and Phys. Norm. and Path.* - XXVI, New Series, Vol. VI, Part. III - April 1892.

de laiterie : Non si deve credere « que l'identité soit absolue, que la puissance d'activité spécifique de toutes les présures soit la même, qui elles se comportent toutes de même sous l'influence de la température, qu'elles aient leur maximum d'action au même point, qu'elles soient détruites au même degré thermométrique. On relève des différences de cet ordre dans les diastases inversives du sucre produites par divers ferments de cette substance, sans que ces diasteses cessent d'appartenir au même type et de pouvoir être appelées du même nom ! ».

Pavia, 28 aprile 1893.

LABORATORIO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ PAVIA

RIVISTA
D'IGIENE E SANITÀ PUBBLICA

REDATTORI:

R. BENTIVEGNA, Ingegnere sanitario, Conservatore del Museo di igiene nella Scuola di perfezionamento nell'igiene pubblica. Roma.

P. CANALIS, Professore di igiene nella R. Università di Genova.

A. PIUTTI, Professore di chimica farmaceutica e Docente di bromatologia nell'Università di Napoli.

A. SCLAVO, Reggente Capo del Laboratorio di batteriologia della Direzione di Sanità pubblica. Roma.

COLLABORATORI ORDINARI:

Ambrosi dott. Vittorio — Armanni dott. Luciano — Badaloni dott. Giuseppe — Bessone dott. Giacomo — Bonasi conte prof. Adeodato — Bordoni Uffreduzzi dott. Guido — Caporaso dott. Luigi — De Giaxa dott. Vincenzo — De Hieronymis dott. Taddeo — Di Mattei dott. Eugenio — Di Vestea dott. Alfonso — Druetti dott. Giuseppe — Fichera ing. Filadelfo — Fortunato dott. Girolamo — Gosio dott. Bartolomeo — Leoni prof. Ottavio — Loriga dott. Giovanni — Maggiora dott. Arnaldo — Mariani dott. Vittorio — Marzolo dott. Antonio — Mascagni dott. Paolo — Misuraca dott. Giovanni — Monari dott. Adolfo — Musso dott. Giovanni — Natali dott. Salvatore — Nosotti dott. Innocente — Paoliani dott. Luigi — Palazzo dott. Luigi — Pampana dott. Ioinio — Panizza dottor prof. Mario — Raseri dott. Enrico — Ravicini dott. Serafino — Roster dott. Giorgio — Salaroli dott. Lamberto — Santoliquido dott. Rocco — Sforza dott. Claudio — Sormanni dott. Giuseppe — Spatuzzi dott. Achille — Torsellini dott. Dante — Tursini dott. Alfonso — Unoaro dottor Goffredo — Valentini dott. Leonardo — Wolner dott. Giulio.

DIREZIONE E AMMINISTRAZIONE

Piazza Vittorio Emanuele, ex-Convento Sant' Eusebio

ROMA

CONDIZIONI D'ASSOCIAZIONE.

La *Rivista* si pubblica il 1° ed il 16 di ogni mese.

Il prezzo d'abbonamento annuo è di L. **12**.

Coloro che desiderano avere i 17 numeri pubblicati nel 1890 e quelli usciti nelle annate 1891-92, potranno ottenerli inviando al nostro Amministratore L. **18**.

Lettere, stampe, giornali, corrispondenze dirigansi alla **Redazione** della *Rivista d'igiene e sanità pubblica* – **Piazza Vittorio Emanuele, isolato Sant'Eusebio – ROMA.**

I manoscritti non si restituiscono.

Per abbonamenti rivolgersi all'Amministratore, signor Cav. Rag. Alceste Marzari, presso la Redazione del giornale.